

関節疾患に及ぼすヒアルロナンの影響

著者	菊池 孝紀
号	398
発行年	1998
URL	http://hdl.handle.net/10097/15338

氏 名 (本籍) ^{きく}菊 ^ち池 ^{たか}孝 ^{のり}紀

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 薬 第 3 9 8 号

学位授与年月日 平 成 10 年 11 月 18 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学 位 論 文 題 目 関節疾患に及ぼすヒアルロナンの影響

論文審査委員 (主 査)
教授 水 柿 道 直 教授 大 内 和 雄

教授 大 泉 康

論文内容要旨

緒言

スポーツ人口の増加、また高齢化社会の到来に伴い、関節における疾患が増加している。特に膝関節における疾患は多く、靭帯損傷や半月板損傷などの外傷性関節炎、変形性関節症（OA）は頻発している。膝関節は、大腿骨および脛骨が靭帯により連結され、それらの間に線維軟骨である半月板が介在する。膝関節では複数の靭帯組織が存在し、それらの中でも膝関節の中央部に存在する前十字靭帯（ACL）および後十字靭帯は関節の機能を維持するために重要な組織である。また、大腿骨および脛骨の関節面は硝子軟骨によって覆われ、物理的衝撃の緩和に重要な役割を果たしている。

外傷性関節炎は、スポーツ時などにおける関節部位への過負荷などによって発症し、特に靭帯損傷の発症頻度は高い。しかし、その修復能は低く、二次的に OA などの疾患を誘発することから、早期の治療が望まれる。また、OA は退行性の軟骨変性を伴う疼痛性の疾患であり、その発症要因として、加齢、性、遺伝、肥満などの内的因子、また外傷性関節炎などによる関節機能の不全に伴う機械的 stress の増加などの外的因子が挙げられ、これらの因子が複雑に関与している。これらの疾患に対する治療法は疾患の程度によって様々であるが、軽度な疾患においては鎮痛や消炎を目的とした薬物の外用剤による投与などの保存的療法が一般に用いられている。

Hyaluronan (HA) は、結合組織に広く存在する N-acetyl-D-glucosamine および D-glucuronic acid の 2 糖による繰り返し構造からなる直鎖の glycosaminoglycan (gag) である。また、HA は関節液の主成分であり、その分子量は約400万とされ、関節の潤滑に重要な役割を果たしているとともに、関節軟骨を被覆して軟骨組織からの matrix 成分の遊離を抑制する作用、軟骨破壊に関与する chemical mediator から軟骨を保護する作用を有するとされている。これらの作用を有することから、OA の治療に HA の関節腔内投与が行われている。また、結合組織において、HA は他の matrix 成分との結合を介して組織の形成に関与している。創傷治癒の初期において、HA は fibrin や fibrinogen と結合して matrix 形成の足場を作ること、また HA は large proteoglycan (PG) である versican や aggrecan と結合し、さらにこれらの aggregate は collagen と結合して巨大分子を形成することが知られている。また、HA は皮膚線維芽細胞の増殖を抑制し、collagen および protein 合成を促進させること、chick embryo の fibroblast および chondroblast においては、細胞増殖を抑制し、collagen および PG 合成を促進させることなどが報告されている。これらの報告は、HA が軟骨や靭帯の細胞に影響を及ぼし、matrix 形成や組織の修復を促進させる可能性を示唆している。本研究では、外傷性関節炎の一つであり、特に修復能が低いとされる ACL 損傷および OA を対象疾患とし、関節腔内への高分子量 HA の投与による影響などについて基礎的に検討した。

1. 靭帯損傷に及ぼす hyaluronan の影響

外傷性関節炎として発症頻度が高く、また修復能が低いとされる ACL 損傷の動物モデルをウサギを用

いて作製し、その修復に及ぼす HA の関節腔内投与による影響を病理組織学的に、また組織の線維形成に影響を及ぼすと考えられる PG の産生について免疫組織学的に検討した。

ACL の部分切離部位は瘢痕性組織によって修復し、瘢痕性組織の範囲は HA の関節腔内投与によって速やかに縮小した。また、病理組織学的にも HA は速やかに正常の靭帯組織に近い組織に修復させた。さらに、HA は靭帯修復の初期に chondroitin sulfate PG の産生を亢進させ、また修復の進行とともにその PG 分子種を速やかに消失させた。この結果は、HA が PG 分子種の産生を制御することによって瘢痕性組織の形成を抑制して速やかに正常な靭帯組織に修復させることを示している。

さらに、HA による靭帯修復促進作用の作用機序を明らかにすることを目的とし、ウサギ ACL より採取した靭帯細胞を用いて細胞増殖能および損傷靭帯の組織修復時に変化が認められた PG の産生に及ぼす HA の影響について検討した。靭帯細胞の増殖能は低く、靭帯の修復能の低いことに関与しているとされているが、この靭帯細胞の増殖能に対して HA は影響を及ぼさなかった。また、靭帯細胞は large PG である versican, aggrecan, さらに small PG である biglycan, decorin を産生し、これらの中でも biglycan を多く産生することが明らかとなった。これらの PG 産生に対し、HA は large PG である versican の合成を促進させた。この結果は、靭帯組織の修復初期における HA 投与による PG 産生の変化を反映していると考えられ、HA 投与によって産生が亢進した chondroitin sulfate PG の分子種が versican である可能性を強く示唆している。すなわち、HA は組織修復の初期に versican の産生を亢進させ、損傷した matrix の再生を促進させたと考えられる。

正常な靭帯組織に含まれる PG 分子種は、dermatan sulfate chain を側鎖とする small PG が主であるとされている。また、本研究においても靭帯細胞の産生する PG 分子種は small PG が主であった。分子サイズの小さな small PG は、他の matrix 成分と密に結合して強靱な組織を形成させると考えられる。一方、分子サイズの大きい versican などの large PG は、epidermis の増殖層や軟骨形成の初期に多量に検出されること、火傷皮膚の修復時に産生が亢進することなどが報告され、また本研究では損傷靭帯の修復の初期に versican-like PG が多く含まれることを示した。これらは、versican が組織の形成および組織修復の初期に matrix を形成するために重要な役割を果たしていることを示唆している。

本研究では、HA が large PG である versican-like PG の産生を促進させて損傷した靭帯を速やかに修復させることを明らかにした。しかしながら、再生した初期の組織は粗な matrix である瘢痕性組織から成り、組織としては未成熟である。瘢痕性組織中には versican が多量に存在することが報告されており、組織中に versican が残存することは瘢痕形成に関与すると考えられる。したがって、瘢痕性組織の少ない正常に近い組織に修復させるためには組織修復後の versican の速やかな消失、さらに正常靭帯組織に多く含まれる small PG の産生への速やかなスイッチが重要であると考えられる。本研究では HA が靭帯修復部位の瘢痕性組織を速やかに減少させ、同時に versican-like PG を減少させることを示した。すなわち、HA は PG の産生を制御して組織修復の過程を速やかに進行させ、正常な組織への再生を促すと考えられる。

2. 変形性関節症に及ぼす hyaluronan の影響

次に、OA に及ぼす HA の関節腔内投与による影響について、発症機序の異なる 2 つの動物モデルを用いて検討した。まず、関節軟骨への機械的 stress を一次的な原因として軟骨変性などの変化を惹起させる実験的 OA として広く知られている ACL 切離による実験的 OA (Pond-Nuki モデル) を作製し、HA の関節腔内投与による影響について検討した。さらに、collagen を主成分とする軟骨組織の破壊に関与すると考えられる matrix metalloproteinase の一つである collagenase の関節腔内注入による新たな実験的 OA の作製を試みるとともに、関節軟骨および滑膜などの変性に及ぼす HA の関節腔内投与による影響について検討した。

ビーグルイヌの ACL 切離による実験的 OA では、ACL 切離後 15 週における関節組織の病理組織学的検査の結果、軽度な軟骨変性がみられ、ヒト OA における初期の症状を示していた。一方、collagenase の関節腔内注入による軟骨変性は、ACL 切離による実験的 OA に比し短期間で、また多くの報告がみられる papain の注入量に比し少量で惹起できた。これらの関節組織における変性はヒト OA に類似しており、実験的 OA として有用なモデルと考えられる。

これらの実験的 OA に対して、HA は関節軟骨の変性の進行を抑制し、また軽度ながら滑膜の変性を抑制した。HA の関節における薬理学的作用の一つとして、関節潤滑を促進する作用が報告されている。すなわち、機械的 stress が一次的な原因と考えられる ACL 切離による実験的 OA では、主に HA の潤滑促進作用が軟骨変性の進行の抑制に関与したと考えられる。また、我々は HA が軟骨組織における GAG 合成に影響を及ぼさず、軟骨組織からの GAG 遊離を抑制することを示し、さらに軟骨細胞の培養系においても軟骨細胞層からの GAG 遊離を抑制することが報告されている。すなわち、collagenase 注入による実験的 OA では、HA は軟骨表面を被覆して matrix 成分を分解する collagenase から軟骨を保護するとともに、軟骨組織や軟骨細胞層を被覆することによって軟骨 matrix の重要な構成成分の一つである GAG の遊離を抑制して軟骨変性を抑制したと考えられる。

しかし、これらの動物モデルにおける軟骨変性に関わる要因は、症状の進行とともに複雑となる。したがって、進行した OA に対する HA の軟骨変性抑制機序も複雑と考えられる。関節潤滑促進作用や軟骨保護作用に加え、HA は様々な作用を有することが知られている。HA は前述した matrix 成分に影響を及ぼすこと、また matrix 成分と結合して組織形成に関与することなどの他に、血管新生を抑制すること、ヒト好中球の遊走能、接着能および貪食能を抑制すること、ヒト末梢血単球、macrophage における IL-1 や prostaglandin E₂ などの産生を抑制することなど、広義の抗炎症作用を有することが示されている。これらの作用は、軽度ながら観察された滑膜の炎症反応の抑制に関与したと考えられ、また関節液中に存在する炎症性細胞に影響を及ぼして軟骨変性や疼痛反応を抑制する可能性も示唆される。また、我々は、insulin を添加することによって軟骨細胞へ分化するマウス embryonal carcinoma 由来細胞株である ATDC 5 を用いた試験により、HA が ATDC 5 の軟骨細胞への分化に影響を及ぼすことなどの知見を得ている (未発表)。したがって、HA は関節潤滑の促進や軟骨組織を被覆することなどの物理的な作用に関与するだけでなく、細胞機能や細胞の分化にも影響を及ぼし、軟骨の形成や再生を促進させると考えられ

る。また、これらの抗炎症作用や細胞機能・分化に対する作用は、関節軟骨の形成や軟骨の修復に関与するだけでなく、靱帯組織の再生にも関与していると考えられる。

結 語

HA は関節液の主成分であり、また matrix の構成成分として必須の物質である。さらに、HA は薬理的にも様々な作用を有する。本研究では、HA が靱帯細胞の PG 産生に影響を及ぼして損傷した靱帯の修復を促進すること、また OA における軟骨変性や滑膜変性の進行を抑制することを示した。これらの結果は、靱帯損傷や OA などの関節疾患の治療に HA の関節腔内投与が有効であることを示している。さらに、HA の有する様々な薬理学的作用は、関節疾患以外の疾患に対しても有効であることを示唆しており、さらなる臨床適応の拡大が望まれる。

審査結果の要旨

靱帯損傷などの外傷性関節炎や変形性関節症（osteoarthritis, OA）は頻繁に発生する関節疾患である。本研究では、まず、外傷性関節炎の一つである前十字靱帯（anterior cruciate ligament, ACL）損傷に対するヒアルロナン（hyaluronan, HA）の関節腔内投与による影響をウサギ ACL の部分損傷モデルを用いて検討した。その結果、関節腔内投与によって、靱帯組織の部分切離部位は瘢痕性組織によって修復され、瘢痕性組織の範囲は速やかに縮小した。また、病理組織学的検討からも、正常の靱帯組織に近い組織に修復された。さらに、HA は靱帯修復の初期にコンドロイチン硫酸プロテオグリカン（proteoglycan, PG）の産生を亢進させ、その後進行に伴い消失させた。

次に、ウサギ ACL より採取した靱帯細胞を用いて細胞増殖能及び損傷靱帯の PG 産生に及ぼす HA の影響を検討した。その結果、HA はこの靱帯細胞の増殖能に対して影響を及ぼさなかった。また、HA 投与による損傷靱帯修復の初期にはコンドロイチン硫酸 PG（バーシカン様 PG）が多く産生されていることを明らかにし、HA のバーシカン産生促進による損傷靱帯の修復機構を示した。

さらに、OA に対する HA の関節腔内投与の影響を検討するにあたり、一般に用いられるイヌ膝関節の ACL 切離による実験的 OA モデル（Pond-Nuki モデル）に加え、ウサギ膝関節腔内へのコラーゲナーゼ注入による新規 OA モデルを確立した。前者は、ACL を切離して動揺関節とし、機械的に軟骨変性などの OA 様の変化を惹起するモデルであるのに対し、後者は、コラーゲナーゼを直接関節腔内に注入し、軟骨マトリックスの主成分であるコラーゲンを分解して軟骨変性を惹起させるモデルである。

これらの実験的 OA に及ぼす HA の関節腔内投与による影響を検討すると、HA はいずれの場合も関節軟骨変性の進行を有意に抑制した。これらの理由として、Pond-Nuki モデルでは、主に HA の潤滑促進作用及び軟骨変性の進行抑制によるものであり、コラーゲナーゼ注入によるモデルでは、軟骨表面を被覆してコラーゲナーゼから軟骨を保護し、さらに軟骨のマトリックス成分の遊離を抑制することによって、軟骨変性を抑制したものと推察された。新規モデルを用いることによって、より広範な HA 作用を明らかにした。

以上、本論文は関節液の主成分でありマトリックスの構成成分として必須の成分である HA が PG の産生制御を介して損傷した靱帯細胞の修復を促進し、軟骨変性や滑膜変性の進行を抑制するため、靱帯損傷や OA などの関節疾患の治療に有効であることなど、臨床応用上も貴重な新規知見を明らかにしたものである。

よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として合格と認める。